Aus der IV. Medizinischen Universitätsklinik Berlin
(Robert-Koch-Krankenhaus)
Leiter: Prof. Dr. med. H. Dennig

Versuche über die Rückbildung von Methämoglobin in reiner Hämoglobinlösung

---

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Medizinischen Doktorgrades

an der

Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin

vorgelegt von

GÜNTER REITZ

aus Liebschütz/Thüringen

Tag der Promotion: 1. Oktober 1941

Buchdruckerei Franz Linke, Berlin NW 7, Marienstr. 13

Gedruckt mit Genehmigung
der
Medizinischen Fakultät der Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. L. Kreuz
Referent: Dozent Dr. Großcurth
Korreferent: Prof. Dr. v. Bergmann

Durch oxydierende Stoffe entsteht aus Hämoglobin Methämoglobin. Das zweiwertige Eisen des Hämoglobins wird dabei dreiwertig und der Sauerstoff wird irreversibel gebunden. Das Hämoglobin ist dadurch nicht mehr in der Lage, den Sauerstofftransport zu besorgen.

Während man früher angenommen hatte, daß das Methämoglobin nicht wieder in Hämoglobin verwandelt werden kann, haben sich unsere Kenntnisse auf diesem Gebiet in letzter Zeit sehr erweitert. Es ist heute bekannt, daß im menschlichen Organismus die Möglichkeit besteht, Methämoglobin in Hämoglobin umzuwandeln. Riedel (1) konnte durch Beobachtung des Gesamteisens und des abgespaltenen Eisens im Blute nachweisen, daß sich Methämoglobin zu Hämoglobin zurückverwandelt. Nach den Untersuchungen von Hauschild (2) eignet sich für die Rückbildung von Methämoglobin zum Hämoglobin am besten das Thionin. Er stellte im Tierversuch fest, daß eine Nitritmenge, die durch ihre Methämoglobinbildung tödlich wirkt, durch vorherige als auch durch nachfolgende Thioninjektionen unwirksam gemacht werden kann. Später konnte er noch nachweisen, daß durch Thioninjektion der Methämoglobingehalt, trotz weiterer Zufuhr von Nitrit, sehr schnell absinkt. Sagel (3) untersuchte die Rückbildung von Methämoglobin durch Katalysin in vitro. Katalysin der Firma Henning ist eine 0,2prozentige stabilisierte Thioninlösung. Er kam zu dem Ergebnis, daß nicht die gesamte Menge durch Katalysin zurückgebildet wird, sondern daß etwa 10 Prozent Methämoglobin zurückbleiben. Groscurth (4) hat ebenfalls die Rückbildung von Methämoglobin durch Katalysin in vitro untersucht. Er bediente sich zur Bestimmung des Methämoglobingehaltes der viel genaueren kalorimetrischen Methode nach Havemann. G. stellte fest, daß unter geeigneten Bedingungen die Rückbildung von Methämoglobin durch Katalysin vollständig ist. Die genannten Untersuchungen wurden an menschlichem Blut gemacht, so daß dabei der Mechanismus nicht klar zu erkennen ist. Es ist von großem Interesse, ob es sich bei der beschriebenen Thioninwirkung um eine direkte Wirkung

auf das Hämoglobin oder um eine Wirkung auf ein anderes Redox-System handelt, das seinerseits dann das Methämoglobin reduziert. Zur Klärung dieser Frage haben wir die Verhältnisse an reinem Hämoglobin bzw. Methämoglobin geprüft.

Ich benutze reines Hämoglobin aus menschlichem Blut, das nach dem Elektrodialyse-Verfahren von Ettisch (5) und Groscurth hergestellt wurde. 500 ccm frisches Blut wurde mehrmals mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und dann zentrifugiert. Der erhaltene Blutkörperchenbrei wurde in einer Tonkammer der Elektrolyse unterzogen. Als anodische Membran diente Glykokoll-Collodium und als kathodische Pergamentpapier. Die auf diesem Wege erhaltene elektrolytfreie Lösung hatte einen Hämoglobingehalt von 10—12 g% und einen Methämoglobingehalt von 0,8—1,5 g%.

Da es auf methämoglobinfreie Lösung nicht ankam, wurde die vorgeschriebene Temperatur von 27° überschritten. Der gewünschte Methämoglobingehalt wurde durch Zugabe von Kaliumferricyanid erreicht. Die Bestimmung des prozentualen Hämoglobin- bzw. Methämoglobingehaltes der Lösung wurde mit dem von Havemann angegebenen Photozellenkolorimeter gemacht, das eine Meßgenauigkeit bis zu 0,1 Prozent des Ergebnisses anzeigt. Von der reinen Hämoglobin-Methämoglobinlösung wurden Stammlösungen hergestellt, die 20 ccm Hämoglobin und Katalysin in Mengen von 1—0,1 Prozent enthielten. Zur Bestimmung des Methämoglobingehaltes wurde von dieser Stammlösung 1 ccm entnommen und mit 20 ccm aqua dest., 20 ccm K. Phosphat und 20 ccm Na-Phosphat verdünnt, so daß die Verdünnung 1 : 61 betrug. Diese Lösung wurde in eine Cüvette gebracht und ihr Gehalt an Methämoglobin im Photozellen-Kalorimeter bestimmt.

Das Ergebnis der Versuche ist folgendes: Wie aus Abbildung 1 ersichtlich ist, bewirkt Katalysin, das einer reinen Hämoglobinlösung zugesetzt wird, die Bildung von Methämoglobin, und zwar ist die gebildete Methämoglobinmenge eine gradlinige Funktion, abhängig von der Zeit. In den ersten 3½ Std. ist die gebildete Methämoglobinmenge ganz unabhängig von der zugebenen Katalysinmenge, wenn sich letztere in den Grenzen von 1—0,1 Prozent hält. Von da ab zeigt sich eine Divergenz der Kurven in dem Sinne,

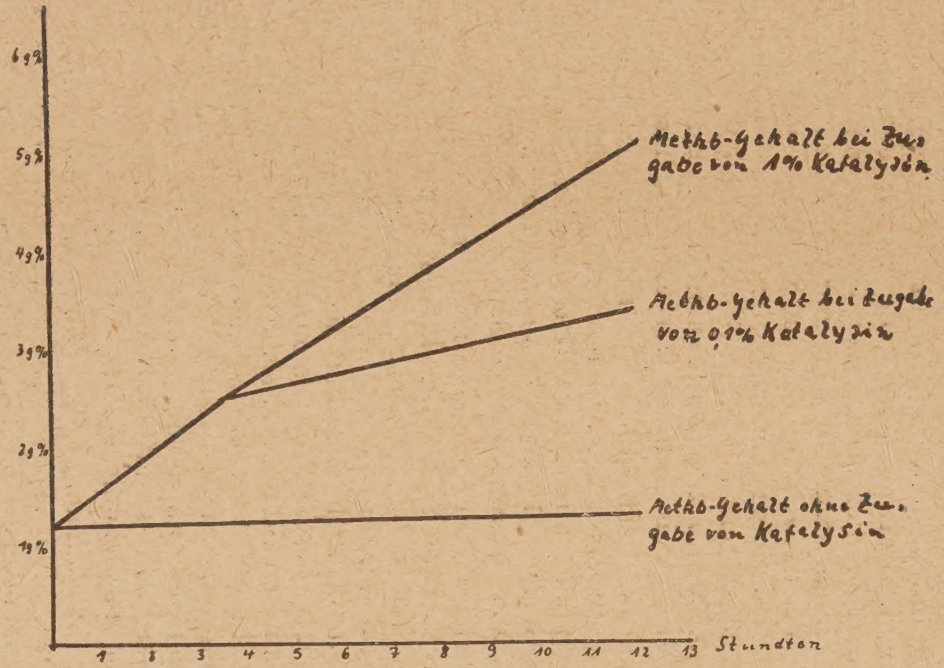

Abb. 1
Bildung von Methämoglobin durch Katalysin

daß bei geringem Katalysingehalt weniger Methämoglobin gebildet wird. Im Verlaufe von 12 Std. war der Ausgangswert von Methämoglobin, der 1,2 Prozent betrug, ohne Zugabe von Katalysin auf 1,3 Prozent angestiegen. Bei Zugabe von 0,1 Prozent Katalysin auf 3,4 Prozent und bei Zugabe von 1 Prozent Katalysin auf 5,1 Prozent angestiegen. In den Grenzen zwischen 1 und 0,1 Prozent sind zahlreiche Untersuchungen durchgeführt worden, die alle grundsätzlich das gleiche Verhalten zeigten. Die Methämoglobinbildung durch Katalysin ließ sich bis zu 12 Std. genau verfolgen, wenn die Stammlösung bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurde. Nach dieser Zeit weichen die Werte stark voneinander ab, in anderen Fällen hört eine weitere Bildung von Methämoglobin ganz auf. Der Grund für dieses Verhalten liegt in der begrenzten Haltbarkeit der Lösung, da sich nach dieser Zeit ein fauliger Geruch feststellen ließ.

Wurde die Stammlösung im Brutschrank auf Körpertemperatur gebracht, so setzte der Effect zeitlich früher ein, das Endergebnis blieb jedoch unverändert. Aus oben erwähnten Gründen konnten diese Versuche nur über drei bis vier Stunden ausgeführt worden.

Vergleichen wir die Ergebnisse mit denen, die von Groscurth und Sagel beschrieben sind, so müssen wir feststellen, daß das Katalysin in einer reinen Hämoglobin-Methämoglobinlösung genau das Gegenteil bewirkt, als wenn es zum menschlichen Blut zugesetzt wird. Der Unterschied in der Wirkung des Thionins im Blut und in reiner Hämoglobin - Methämoglobinlösung läßt sich nur so erklären, daß im Blut ein anderes Redox-System durch Zusatz von Thionin angestoßen wird, das die Reduktion von Methämoglobin zum Hämoglobin vollzieht. In reiner Hämoglobinlösung trifft es auf ein System, wo Thionin die Oxydation von Hämoglobin bewirkt.

Durch Bestimmung des Methämoglobingehaltes im menschlichen Blut wurde beobachtet, daß ein geringer Methämoglobingehalt im Blut vorhanden ist, der sich bezüglich seines Wertes sehr verschieden verhält. Durch die Versuche von Riedel wurde bewiesen, daß das Methämoglobin, wenn es höhere Werte annimmt, nicht ausgeschieden, sondern zurückgebildet wird. Es liegt daher die Annahme nahe, daß im Blut ein Stoff sein muß, der die Rückbildung bewirkt. Um dieses zu beweisen, wurde der reinen Hämo-

globin-Methämoglobinlösung frisches menschliches Blut hinzugesetzt. Es wurde mit der Injektionsspritze, in welcher sich Natrium citrium befand, aus der Armvene entnommen.

Es zeigte sich hierbei, daß kleine Zugaben von Blut, die unter dem Verhältnis von 1 Teil Blut und 1 Teil Hämoglobin-Methämoglobinlösung liegen, in keinem Fall den Methämoglobingehalt beeinflußten. Doch schon bei Zugabe von 1 Teil Blut zu 1 Teil Lösung läßt sich bei der Hälfte der untersuchten Fälle eine Rückbildung von Methämoglobin zum Hämoglobin feststellen. Die Rückbildung wird um so deutlicher, je mehr man sich dem Verhältnis von 2 Teilen Blut zu 1 Teil Lösung nähert. Versuche mit Zugabe von noch größeren Blutmengen konnten nicht gemacht werden, da sonst der Methämoglobingehalt nach der Verdünnung durch Blut nicht mehr meßbar gewesen wäre. In den Fällen, wo eine Rückbildung von Methämoglobin eintrat, verhielt sich der Methämoglobingehalt, wie er in Abb. 2 aufgetragen ist. In diesem Fall war in der Lösung ein Methämoglobingehalt von 5,7 g%, der durch Zugabe von Kaliumferricyanid zur reinen Hämoglobinlösung erreicht wurde. Zu einem Teil Lösung wurden zwei Teile Blut hinzugesetzt. Nach diesem Verdünnungsverhältnis durch Blut wäre ein Methämoglobingehalt von 1,9 g% zu erwarten gewesen, der tatsächliche Wert war aber nur 1,1 g%. Das Blut hat also 0,8 g% Methämoglobin zurückgebildet. Der Effekt tritt sofort nach der Zugabe von Blut ein und hält bis zu 1½ Std. an, um dann wieder auf den natürlichen Wert abzusinken. Bei diesen Versuchen zeigte sich eine starke individuelle Verschiedenheit des Blutes bezüglich der Rückbildung von Methämoglobin. In der Hälfte der untersuchten Fälle trat eine Rückbildung von Methämoglobin zum Hämoglobin ein, und zwar in der Art, wie es in Abb. 2 aufgetragen ist. In vereinzelten Fällen wurden größere Effekte erreicht. So wurde in einem Fall sogar 1,7 g% Methämoglobin durch Blut zurückgebildet. Da der Patient am nächsten Tag ad exitum war, konnten weitere Versuche mit diesem Blut nicht gemacht werden. In der anderen Hälfte der untersuchten Fälle trat eine Rückbildung nicht ein. Hier war meist schon im Blut ein größerer Methämoglobingehalt vorhanden als in den Fällen, wo das Blut Methämoglobin zurückbildete. Auch wurde in diesen Fällen bei längerem Stehen der Lösung an der Luft eine stärkere Methämoglobinbildung

beobachtet. In diesen Fällen kann wohl angenommen werden, daß der im Blut befindliche Stoff schon verbraucht ist und das Blut nun nicht mehr in der Lage ist, die Rückbildung zu vollziehen und die Bildung von Methämoglobin dadurch erleichtert ist.

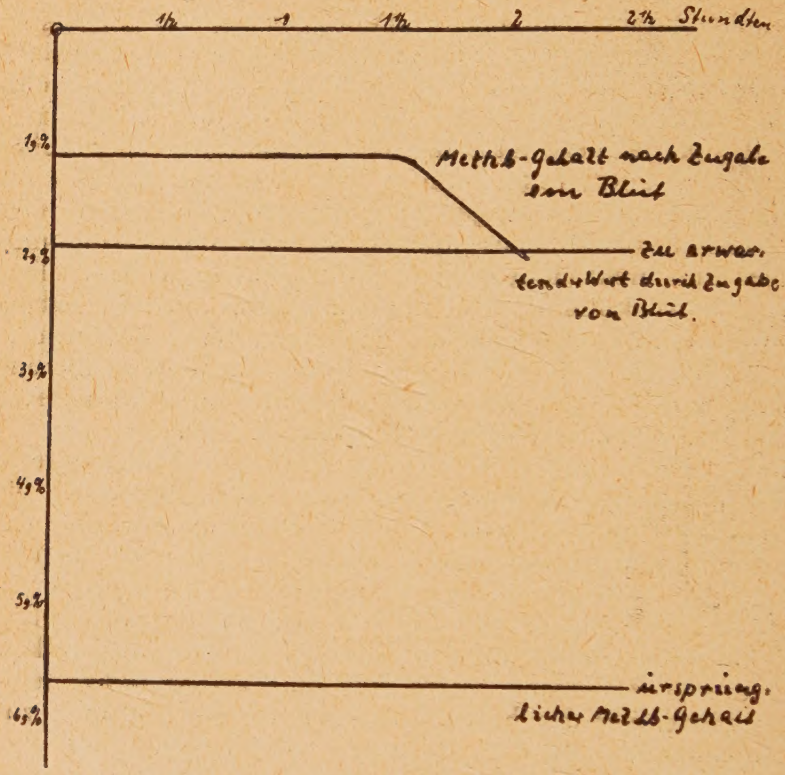

Abb. 2
Rückbildung von Methämoglobin durch Blut

Zur Klärung der Frage, welcher Stoff im Blute die Rückbildung bewirkt und woran er gebunden ist, wurde der Hämoglobin-Methämoglobinlösung das Serum von dem Blut zugesetzt, welches Methämoglobin zurückbildete. Der Methämoglobingehalt hat sich hierbei immer nur um so viel verringert, wie durch die Verdünnung zu erwarten war. Im Serum kann demnach der vermutete Stoff nicht sein.

Auch durch Zugaben von Zucker in Mengen, wie er im Blut vorhanden ist, ging der Methämoglobingehalt nicht zu-

rück. Wurde Zucker plus Katalysin zugegeben, so verhielt sich der Methämonglobingehalt genau so, wie wenn nur Katalysin zugegeben worden wäre.

In einer anderen Versuchsreihe wurde der Lösung Cystein in Mengen von 1—0,1 Prozent zugesetzt. Hierbei ergibt sich, daß der Methämoglobingehalt sofort nach Zugabe von Cystein in der Mehrzahl der untersuchten Fälle abfällt. Von 36 untersuchten Fällen ging der Methämoglobingehalt in 28 Fällen von 1,4 g% zurück auf 1,0 g%. Der Rückgang ist gering, er liegt jedoch außerhalb der Fehlergrenze. Wie aus Abb. 3 zu ersehen ist, nimmt der Methämoglobingehalt nach 4½ Std. wieder zu und erreicht nach 8 Std. den Wert, den die Lösung ohne Cysteinzusatz hat. Bis zur 12. Std. steigt der Methämoglobingehalt dann noch weiter an und übersteigt den ursprünglichen Wert noch um 0.4 g%. Temperaturerhöhungen hatten hierbei keinerlei Einfluß auf das Ergebnis. Wurde zur Hämoglobin - Methämoglobinlösung Cystein und Katalysin zugegeben, so verhielt sich der Methämoglobingehalt so, als ob nur Katalysin zugesetzt worden wäre, der Einfluß, der vom Cystein zu erwarten gewesen wäre, blieb völlig aus. Nur in einzelnen Fällen erreichte der Methämoglobingehalt nicht ganz die Werte, die er bei alleiniger Zugabe von Katalysin erreicht hätte. Diese Fälle sind jedoch in ihrer Anzahl zu wenig und nicht einheitlich genug, um sie verwerten zu können.

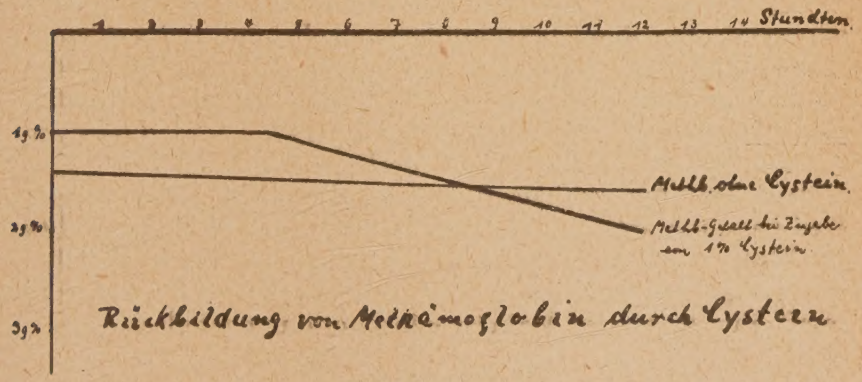

Abb. 3
Rückbildung von Methämoglobin durch Cystein

Vergleichen wir Abb. 1 und 3 miteinander, so sehen wir, daß bei Zusatz von Katalysin die Wirkung erst nach ½ Std.

einsetzt, bei Zusatz von Cystein dagegen setzt sie sofort ein, jedoch in umgekehrter Richtung bis zur 8. Std. Von dieser Zeit an bewirkt auch Cystein die Bildung von Methämoglobin.

Die hier beschriebenen Versuche haben ergeben, daß Katalysin, einer reinen Hämoglobinlösung beigegeben, die Bildung von Methämoglobin bewirkt, während, wie oben erwähnt, bei Zugabe von Katalysin zu Vollblut das Methämoglobin völlig zurückgebildet wird. Ueber den Grund des verschiedenen Verhaltens von Katalysin sind schon Betrachtungen angestellt worden. Menschliches Serum oder Zucker, der Lösung zugesetzt, sind ohne Einfluß auf den Methämoglobingehalt. Dagegen haben die Versuche, bei denen Blut bzw. Cystein der reinen Hämoglobin-Methämoglobinlösung zugegeben wurde, bewiesen, daß eine Rückbildung stattfindet. Ob Cystein allein die Rückbildung bewirkt, kann nicht gesagt werden. Bewiesen ist durch diese Versuche, daß der Stoff, der die Rückbildung von Methämoglobin vollzieht, in den Blutkörperchen enthalten ist. Daß gerade in dem Blut, welches nicht die reduzierende Kraft besitzt, mehr Methämoglobin enthalten ist, spricht ebenfalls für obiges Ergebnis. Es ist hierbei anzunehmen, daß in diesen Fällen der Stoff schon verbraucht ist und das Blut daher keine Reduktionskraft mehr hat. Auch von anderen Beobachtungstatsachen aus gesehen läßt sich dieser Standpunkt vertreten. Bei der Sulfanilamidbehandlung wurde immer wieder die Beobachtung gemacht, daß bei größeren Gaben dieser Medikamente bei einem Teil der Patienten Methämoglobinamie auftritt. So hatten manche Patienten nach den Veröffentlichungen von Bensky und Ross am vierten Tag bis zu 22 Prozent Methämoglobin im Blut. Der andere Teil der Patienten, welche dieselben Dosen dieser Medikamente bekamen, hatten dagegen kein Methämoglobin im Blut. Auch bei diesen Fällen ist anzunehmen, daß bei der einen Gruppe dieser Stoff schon verbraucht war und somit eine so starke Methämoglobinbildung möglich war.

Zusammenfassung.

Es wurde Hämoglobinlösung Katalysin in verschiedenen Mengen zugesetzt, das Ergebnis war die Bildung von Methämoglobin. Blut reiner Hämoglobinlösung zugesetzt, bewirkt eine Rückbildung des Methämoglobins. Es zeigte

sich hierbei eine starke individuelle Verschiedenheit des Blutes bezüglich der Rückbildung. Zugabe von Zucker und Serum hatten keinen Einfluß auf den Methämoglobingehalt. Cystein bewirkte gleichfalls eine geringere Rückbildung von Methämoglobin. Cystein und Katalysin zugesetzt bewirkt Bildung von Methämoglobin.

Literatur.

1. Riedel, Naunyn-Schmiedebergs-Archiv, 190, 223, 1938.
2. Hauschild, Naunyn-Schmiedebergs-Archiv, 184, 458, 193
3. Sagel.
4. Groscurth.
5. Ettisch und Groscurth.
6. Bensky und Ross, Canad med. Assoc. J. 37, 62—64.

Lebenslauf.

Am 26. Oktober 1907 bin ich in Liebschütz/Thür. geboren. Als ich sieben Jahre alt war, fiel mein Vater im Weltkrieg. Ich besuchte bis zu meinem vierzehnten Lebensjahr in Liebschütz die Schule und blieb noch nach der Schulentlassung ein Jahr dort, um meinen Großeltern in der Landwirtschaft zu helfen.

Im Jahre 1922 kam ich nach Berlin und war hier zunächst im Geschäft meines Stiefvaters tätig und lernte Kaufmann. Ich legte dann als Extraner die Reifeprüfung ab und bezog zum Sommer-Semester 1936 die Universität Berlin, um Medizin zu studieren. Im Oktober 1940 habe ich an selbiger Universität das medizinische Staatsexamen bestanden.